**مقاله پژوهشی**

# Quantitative and qualitative determination of the leaf and seed alcoholic extract of *Peganum harmala* and the evaluation of antioxidant properties of the extract

**Saeedeh Fahimi[1], Shahrbanoo Oryan[2], Ramesh Ahmadi [3*], Akram Eidi[1]**

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Animal Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
3. Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University of Qom, Qom, Iran



## Abstract

**Aim and Background:** Harmal or Spand is one of the medicinal plants with the scientific name of *peganum harmala* and belongs to the Zygophylaceae family. Beta-carboline belongs to the group of indole alkaloids and is present in different parts of the plant, especially seeds and roots. Beta-carbolines exert a range of neurophysiological and toxic effects, including antidepressant activity, vasodilation, anti-cumulative effects of platelets, and effects on drug withdrawal and appetite. The aim of this study was to extract and measure beta-carbolines as well as phenolic compounds of Pecan plant species and to investigate its antioxidant properties.

**Materials and Methods:** For this purpose, this plant was collected from around Zahedan and methanolic extract of leaves and seeds were extracted by Soxhlet method. Then different phytochemical analyzes were performed on the leaves and seeds of this plant. Quantitative and qualitative analyzes included identification of anthocyanins, flavonoids, tannins, anthraquinones, antioxidant test of the extract, FTIR analysis of the extract, quantitative and qualitative HPLC analysis of the extract and alkaloids.

**Results:** The results showed that Harmine was toxic at a much lower dose than the seed extract, and the seed extract can be toxic in low doses than leaf extract. In the leaf extract, compared to the seed extract, the amounts of alkaloids are small, and its antioxidant effects are greater due to the higher amounts of polyphenols and flavonoids.

**Conclusion:** The results showed that although the antioxidant properties of methanolic extract of leaves (due to the presence of flavonoids and phenolic compounds) are higher than seeds, but there is more beta-carboline in plant seeds.

**Keywords:** *Peganum harmala*, Beta–carbolines, High-performance liquid chromatography, Antioxidant, Iau Science.

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.52.1.5 ]

**Corresponding author:**
Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad university, Qom, Iran
**Email:** rameshahmadi5768@gmail.com

**مقاله پژوهشی**

# اندازه گیری کمّی و کیفی عصاره الکی برگ و دانه گیاه اسپند و ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره

**سعیده فهیمی[۱] ، شهربانو عریان[۱،۲]، رامش احمدی[۳]*، اکرم عیدی[۱]**

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲. گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۳. گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران



## چکیده

**سابقه و هدف:** گیاه اسپند یکی از گیاهان دارویی با نام علمی *Peganum harmala* و از خانواده Zygophylaceae می‌باشد. بتاکاربولین متعلق به گروه آلکالوئیدهای ایندول است که در بخش‌های مختلف گیاه به ویژه دانه و ریشه حضور دارند. بتاکاربولین‌ها، طیفی از اثرات نوروفیزیولوژیکی و سمّی از جمله فعالیت‌های ضدافسردگی، اتساع عروقی، اثرات ضد تجمعی پلاکت‌ها و اثر بر ترک دارو و اشتها را اعمال می‌کنند. هدف از این تحقیق، استخراج و اندازه‌گیری بتاکاربولین‌ها و نیز ترکیبات فنولی گونه گیاهی اسپند و بررسی خواص آنتی اکسیدانی آن می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** برای این منظور این گیاه از اطراف زاهدان جمع آوری گردید و عصاره متانولی برگ و دانه به روش سوکسله استخراج شد. در ادامه آنالیزهای فیتوشیمیایی مختلف بر روی برگ و دانه این گیاه صورت گرفت. آنالیزهای کمّی و کیفی شامل شناسایی آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، آنتراکینون‌ها، تست آنتی اکسیدانی عصاره، آنالیز FTIR عصاره، آنالیز کمّی و کیفی HPLC عصاره و آلکالوئیدها بود.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که هارمین در دوز بسیار کمتری نسبت به عصاره دانه، سمّی است و عصاره دانه در دوزهای پایین نسبت به عصاره برگ می‌تواند سمّی باشد. در عصاره برگ نسبت به عصاره دانه مقادیر آلکالوئیدها ناچیز بوده و اثرات آنتی-اکسیدانی آن به علت مقادیر بیشتر پلی‌فنلی و فلاونوئیدها بیشتر می¬باشد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که اگرچه خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی برگ‌ها (به دلیل وجود فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی) بیشتر از دانه‌ها است، امّا میزان بتاکاربولین بیشتری در دانه‌های گیاه وجود دارد.

**واژگان کلیدی**: اسپند، بتاکاربولین‌ها، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، آنتی‌اکسیدانی، Iau Science.

## مقدمه

گیاه اسپند (*Peganum harmala* L.) از خانواده Zygophylaceae در مناطق نیمه خشک از جمله در ایران (شکل ۱)، مناطق استپی و خاک‌های شنی می‌روید (۱). منشاء اولیه اسپند آسیای مرکزی است اما امروزه این گیاه در استرالیا، شمال آفریقا و جنوب غرب آمریکا نیز رشد می-کند (۲). این گیاه بوته‌ای بوده و دارای برگ‌های سبز با تقسیمات باریک و نامنظم است. گل‌های درشتی دارد و کاسبرگ‌ها نازک و گلبرگ‌ها بزرگ می باشند. میوه این گیاه پوشینه است و حاوی دانه‌های فراوان سیاه رنگ است.

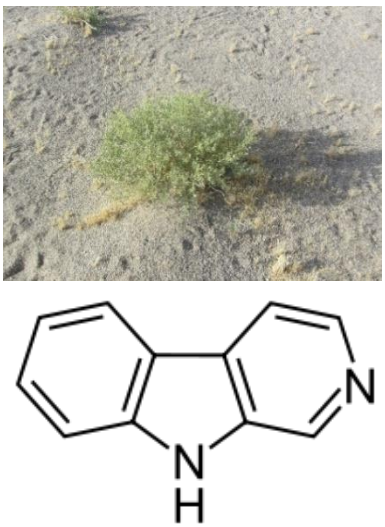
**نویسنده مسئول:**
گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
پست الکترونیکی: rameshahmadi5768@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۱

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.52.1.5 ]

کاربردهای فراوانی از این گیاه گزارش شده است از جمله فعالیت‌های روانگردان (۳)، اثر ضدباکتریایی بر روی استافیلوکوکوس مقاوم و حساس به متی‌سیلین (۴)، درمان عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو (۵)، فعالیت مهارکننده و کشنده بر روی مخمرهای کاندیدا (۶)، همچنین اثرات ضددیابتی (۷)، اثرات ضدسرطانی (۸) و طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های سیتوتوکسیتی در برابر خطوط سلولی سرطان ریوی در انسان‌ها را دارد (۱۱-۹). مطالعات کینتیکی نیز نوعی مهار رقابتی و برگشت‌پذیر در عصاره دانه را نشان داده‌اند که شش برابر قوی تر از ریشه است. این نتایج نشان می‌دهد که اثرات سمی و دارویی عصاره‌های اسپند ناشی از حضور بتاکاربولین و اثرات مهاری مشهود آنها بر روی مونوآمین اکسیدازA (MAO-A) می-باشد. در واقع، β–کاربولین ها با مهار MAO-A سطوح سروتونین مغز و سایر نوروترانسمیترها را افزایش می‌دهند و این، بدان معناست که عصاره دانه و ریشه این گیاه خواص ضد افسردگی دارد (۱۱). ساختار β-کربولین شبیه به تریپتامین است، با زنجیره اتیل‌آمین که دوباره از طریق یک اتم کربن اضافی به حلقه ایندول متصل می شود تا ساختاری سه حلقه ای ایجاد کند. در واقع، یک ساختار سه حلقه‌ای است که شامل یک سیستم حلقه ایندول است که به C-3 و C-4 یک حلقه پیریدینی متصل شده است (شکل۱) (۱۱). آلکالوئیدهای بتاکاربولینی از جمله هارمین، هارمالین از ترکیبات بارز این گیاه هستند و در بخش‌های مختلف گیاه به ویژه دانه و ریشه حضور دارند (۱۳، ۱۲). با توجه به اینکه بسته به محل رویش این گیاه درصد ترکیبات مؤثره آن تغییر می‌کند، همچنین با توجه به اثرات فراوانی که در درمان بیماری مختلف داشته است، بررسی میزان این ترکیبات در این گیاه اهمیت بالایی دارد. هدف از این تحقیق، استخراج و اندازه‌گیری ترکیبات بتاکاربولینی برگ و دانه اسپند جمع آوری شده از اطراف شهرستان زاهدان و بررسی خواص آنتی اکسیدانی آن می‌باشد.



**شکل ۱**- تصویری از بوته گیاه اسپند در منطقه اطراف زاهدان و فرمول ساختار شیمیایی بتاکاربولین

## مواد و روش‌ها

### جمع آوری گیاه اسپند

گیاه اسپند از مراتع اطراف شهر زاهدان (۵ کیلومتری زاهدان) در فصل بهار به میزان لازم جمع آوری گردید و به تهران منتقل گردید (شکل۱). گیاه به طور کامل در دمای محیط خشک گردید. سپس برگ و دانه آن به طور جداگانه از شاخه‌ها جدا گردید. بعد از آن جهت عصاره‌گیری به مرکز تحقیقاتی گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج ارسال گردید. از سوی دیگر ماده شیمیایی هارمین که ماده مؤثره موجود در برگ و دانه اسپند می باشد به صورت لئوفیلیزه از شرکت سیگما الدریچ از آمریکا تهیه گردید.

### عصاره گیری از دانه و برگ اسپند

در این روش ابتدا نمونه گیاهی را با استفاده از خردکن، خرد کرده و سپس مقدار ۱۰۰ گرم از گیاه را در درون انگشتانه ریخته و در قسمت میانی سوکسله قرار داده شد. مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول در درون بالن ریخته و تمام قطعات سوکسله به هم متصل گردید، سپس برای مدت ۴ ساعت عصاره گیری طی ۲۰ بار سیفون شدن ادامه یافت و در انتها حلال با تبخیر در خلاء از عصاره جدا و در یخچال نگهداری شد و پس از آن جهت انجام آنالیزهای فیتوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت (۱۴).

### استخراج آلکالوئیدهای دانه و برگ اسپند

ابتدا به ۱ گرم از پودر گیاه خشک، ۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵٪ اضافه نموده و ۲۴ ساعت در دمای معمولی آزمایشگاه قرار داده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۵٪ به آن اضافه نموده و در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در ادامه محلول رویی را صاف کرده و به باقیمانده مجدداً ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۵٪ اضافه شد و مجدداً ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. عمل استخراج ۳ بار تکرار شد و سرانجام محلول‌ها با هم مخلوط شدند. با انجام سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.52.1.5 ]

و ۳۰۰۰ دور در دقیقه رسوبات از محلول الکلی جدا شده و سپس محلول الکلی در بشر ریخته شد و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد تبخیر گردید. با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۵٪ و ۱۰ میلی‌لیتر دی اتیل اتر، دیواره ظرف شستشو شد. عصاره حاصل از فاز اسیدی زیرین جدا می‌شود. برای این کار فاز اسیدی به کمک سود ۱۰ مولار به pH ۱۰ رسانده شد. هم حجم محلول قلیایی کلروفرم اضافه کرده و فاز کلروفرمی زیرین جمع آوری گردید.

این عمل سه بار تکرار شد و مجموع فاز کلروفرمی زیرین جدا شد. برای اطمینان یک بار دیگر هم حجم مجموع فاز کلروفرمی زیرین، کلروفرم اضافه کرده و فاز کلروفرمی زیرین جدا می‌شود، سپس فاز کلروفرمی‌های جمع آوری شده در دمای پایین تبخیر شدند. در نهایت با استفاده از ۵ میلی‌لیتر متانول خالص دیواره ظرف شست و شو داده شد (۱۵). در نهایت آلکالوئیدهای استخراج شده برای آنالیز کمّی و کیفی توسط دستگاه HPLC آماده شدند.

**غربال‌گری متابولیت‌های ثانویه**

متابولیت‌های ثانویه شامل آلکالوئیدها، آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها، تانن‌ها و آنتراکینون‌ها می‌باشند که هر کدام روش‌های شناسایی مربوط به خود را دارند. جهت شناسایی این متابولیت‌ها، روش‌های آزمایشگاهی ذیل صورت گرفته است (۱۶).

**الف) شناسایی آلکالوئیدها**

در یک بشر کوچک به ۰/۵ گرم عصاره متانولی خشک ۱۵ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۲ مولار اضافه شد. سپس در داخل بن‌ماری به مدت ۵ دقیقه توسط همزن، همزده و با فیلتر کاغذی صاف شد. محلول شفاف زیر صافی که حجمی در حدود ۱۵-۱۰ میلی‌لیتر دارد در سه لوله آزمایش تقسیم شد. به لوله اول چند قطره معرف مایر اضافه شد که در صورت مثبت بودن حضور آلکالوئیدها در گیاه ایجاد رسوب سفید مایل به زرد می‌نماید. به لوله دوم چند قطره معرف واگنر اضافه شد که در صورت مثبت بودن حضور آلکالوئیدها در گیاه رسوب قرمز-قهوه‌ای سوخته ایجاد می‌شود. به لوله سوم آنقدر آمونیاک اضافه شد تا محیط به طور کامل بازی شود (کاغذ تورنسل آبی شود). سپس مخلوط فوق با ۳ بار (هر بار ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم) استخراج و فاز کلروفرمی روی هم اضافه و توسط تبخیر کننده دوار خشک شد، به باقیمانده حدود ۳ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۲ نرمال افزوده و روی بن‌ماری خشک گردید. محتوی به ۲ لوله آزمایش دیگر منتقل شد. به لوله اول چند قطره معرف مایر اضافه شد که در صورت مثبت بودن حضور آلکالوئیدها در گیاه ایجاد رسوب سفید مایل به زرد می‌نماید. به لوله دوم چند قطره معرف واگنر اضافه کرده که در صورت مثبت بودن حضور آلکالوئیدها در گیاه رسوب قرمز-قهوه‌ای سوخته ایجاد می‌کند.

**ب) شناسایی آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها**

روش استفاده شده برای شناسایی این متابولیت‌ها به آزمون شینودا معروف است. در این روش، حدود یک گرم از عصاره متانولی خشک ابتدا ۳ بار توسط ۴ میلی‌لیتر اتر دوپترول شستشو داده تا رنگ و چربی عصاره گرفته شود. به عصاره ۲ میلی‌لیتر مخلوط (۵۰:۵۰) آب- متانول اضافه شد. در مرحله بعد افزودن ۲ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک غلیظ و ظهور رنگ قرمز نشانگر حضور آنتوسیانین است. با افزودن مقدار کمی پودر Mg و ایزوبوتانول محلول دو فازی می‌شود؛ اگر فاز رویی قرمز شود نشانگر حضور فلاونوئید و اگر فاز زیرین قرمز باشد نشانگر حضورآنتوسیانین است، در صورت قرمز بودن هر دو فاز دلیل بر این است که گیاه هم آنتوسیانین و هم فلاونوئید را داراست. برای اطمینان می‌توان از عصاره متانولی با حلال ۴ تایی کروماتوگرافی لایه نازک انجام داد، بعد از جداسازی، معرف آنیزآلدهید را روی کاغذ TLC اسپری نموده، ظهور رنگ زرد بر روی برخی لکه‌ها نشان دهنده وجود فلاونوئیدهاست.

**ج) شناسایی تانن‌ها**

برای انجام این کار ابتدا مقدار ۱۵ میلی‌لیتر از آب مقطر در لوله آزمایش جوشید. حدود ۰.۵ گرم از عصاره در این آب مقطر حل شد. بعد از رسیدن آب مقطر به دمای آزمایشگاه ۲ تا ۴ قطره محلول کلرید سدیم ۱۰٪ به منظور رسوب دادن ترکیبات غیرتاننی اضافه شد. سپس عصاره حاصل صاف شد و در ۴ لوله آزمایش تقسیم شد. در گام بعدی به لوله اول ۴ تا ۵ قطره محلول ژلاتین افزوده شد. به لوله دوم ۴ تا ۵ قطره محلول ژلاتین نمک‌دار (یک درصد ژلاتین به نمک ۱۰٪ اضافه می‌شود) و به لوله سوم ۴ تا ۵ قطره محلول کلرورفریک ۰/۵٪ اضافه گردید. تانن‌ها با محلول ژلاتین تولید رسوب و با محلول کلرورفریک ایجاد رنگ سبز یا آبی نمودند.

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.52.1.5 ]

**د) شناسایی آنتراکینون‌ها**

روشی که برای غربالگری آنتراکینون‌ها مورد استفاده قرار گرفته به روش بورن‌تراگر[1] معروف است (۱۷). در این روش حدود ۰/۵ گرم یا کمتر از عصاره در ۱۰ میلی‌لیتر از هگزان حل و داخل یک لوله آزمایش جدا شد. سپس ۴ میلی‌لیتر آمونیاک غلیظ با پیپت پاستور به زیر فاز هگزانی وارد شد، با نارنجی شدن فاز آبی وجود آنتراکینون تایید گردید.

**آزمون آنتی اکسیدانی عصاره**

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) با فرمول شیمیایی $C_{18}H_{12}N_5O_6$ یک ترکیب شیمیایی است. ترکیبی است بنفش رنگ که به دلیل حضور گروه های فنیل در ساختار آن، به راحتی به صورت رادیکال درآمده و در واقع منبع رادیکال آزاد می باشد. زمانی که رادیکال در معرض یک احیاگر قرار می‌گیرد، جذب آن متناسب با تعداد الکترون‌هایی که می‌گیرد کاهش می‌یابد. بنابراین کاهش جذب آن را به عنوان معیاری از خاصیت ضداکسایشی (آنتی اکسیدانی) عصاره در نظر می‌گیرند. حل شدن این رادیکال در متانول ایجاد رنگ ارغوانی تیره می‌کند که تحت تاثیر حضور ضداکسایندهها (آنتی اکسیدان ها)، رنگ زدایی در محلول DPPH صورت می‌گیرد و در نتیجه رنگ آن از ارغوانی تیره به زرد روشن تغییر یافته و میزان جذب کاهش می‌یابد. هرچه ترکیبات ضد اکساینده از قدرت بیشتری برای احیای DPPH برخوردار باشند، میزان جذب کمتر خواهد بود. بنابراین از رادیکال مصنوعی DPPH به عنوان یک گزینه مناسب برای بررسی فعالیت ضداکسایشی ضداکسایندههای طبیعی استفاده می‌شود (۱۸).

**روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)**

ابتدا ۲۵ میلی‌گرم (با استفاده از ترازوی آنالیتیکال) از نمونه عصاره متانولی در بالن حجمی ۲۵ میلی‌لیتری با متانول به حجم رسانده شد (غلظت محلول استوک در این مرحله ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر است) سپس ۸ میلی‌لیتر از محلول استوک در بالن ۱۰ میلی لیتری با متانول به حجم رسیده (غلظت محلول در این مرحله ۰/۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر است) و در مرحله بعد ۵ میلی‌لیتر از محلول استوک در بالن ۱۰ میلی‌لیتری با متانول به حجم رسید (غلظت محلول در این مرحله ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر است). در این مرحله ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول استوک در بالن ۱۰ میلی‌لیتری با متانول به حجم می‌رسد (اکنون غلظت محلول در این مرحله ۰/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر است). رقیق سازی همچنان ادامه می‌یابد به طوری که ۱ میلی‌لیتر از محلول استوک در بالن ۱۰ میلی‌لیتری با متانول به حجم می‌رسد (غلظت محلول در این مرحله ۰/۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر است). در مرحله بعد ۱ میلی‌لیتر از محلول ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در بالن ۱۰ میلی‌لیتری با متانول به حجم می‌رسد (غلظت محلول در این مرحله ۰/۰۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر است) و درگام بعدی ۱ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در بالن ۱۰ میلی‌لیتری با متانول به حجم می‌رسد (غلظت محلول در این مرحله ۰/۰۰۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر است). در انتها ۱ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۰۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در بالن ۱۰ میلی‌لیتری با متانول به حجم رسانیده می‌شود (غلظت محلول در این مرحله ۰/۰۰۰۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر است).

**تهیه محلول DPPH**

به میزان ۶/۷ میلی‌گرم از DPPH در بالن ۵۰ میلی‌لیتری تیره با متانول به حجم می‌رسد (برای تست مقدماتی ۱ میلی‌لیتر از محلول ساخته شده را با ۱ میلی‌لیتر متانول در لوله تیره رنگ مخلوط نموده و بعد از نیم ساعت در طول موج ۵۱۷ نانومتر در حضور شاهد متانول جذب خوانده می‌شود، اگر جذب در محدوده ۱/۷-۲/۰۸ بود مناسب است). در این مرحله در کنار ۷ بالن تیره ۷ بالن روشن قرار می گیرد. ۱ میلی‌لیتر از بالن روشن داخل بالن تیره ریخته شد و به هر کدام ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH اضافه گردید. یک لوله تیره شاهد حاوی ۱ میلی‌لیتر DPPH و ۱ میلی‌لیتر متانول نیز تهیه و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه جذب محلول‌ها را در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد (با محلول بالن روشن جذب دستگاه صفر شد و سپس جذب محلول تیره خوانده شد). جذب‌ها سه بار خوانده شد و میانگین و انحراف استاندارد طبق محاسبات زیر بدست آمد.

$$\text{درصد مهار} = \frac{\left(\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}\right)}{\text{جذب شاهد}} \times 100$$

با رسم نمودار درصد مهار رادیکال آزاد DPPH بر حسب غلظت برای نمونه‌ها و اعمال رگرسیون خطی و به کمک معادله خط حاصل از رگرسیون خطی، $IC_{50}$ گزارش گردید.

**آنالیز FT-IR و HPLC عصاره**

برای مقایسه کمّی و کیفی گروه‌های عاملی موجود در عصاره متانولی برگ و دانه گیاه آنالیز طیف سنجی مادون

[1] . Borntrager

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.52.1.5 ]

قرمز تبدیل فوریه با دستگاه WQF-510 FTIR انجام شد و طیف‌های بدست آمده مقایسه و تفسیر گردید. همچنین نمونه مورد نظر با دستگاه کروماتوگرافی , KNAUER HPLC با ستون $C_{18}$ و فاز متحرک ایزوپروپیل الکل:استونیتریل:آب:فرمیک‌اسید (۳:۳۰۰:۱۰۰:۱) و سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و طول موج ۳۳۰ نانومتر آنالیز شد و کروماتوگرام‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

**تحلیل آماری**

تمام مراحل به طور مشابه ۳ بار تکرار شد. همچنین داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از SPSS 20.0 (شیکاگو، ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. آزمون تی برای تجزیه و تحلیل تفاوت بین گروه‌ها انتخاب شد. $P<0.05$ از نظر آماری معنی‌دار بود.

## یافته‌ها

**آنالیز فیتوشیمیایی عصاره گیاهی**

همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، عصاره متانولی دانه و برگ به ترتیب ۲۹/۷٪ و ۳۱/۷٪ می باشد. IC50 برای دانه‌ها ۱۲۲/۱، برای برگ ۲۰۰، و کل ترکیبات فنلی (mg GAE/mg) برای دانه ۳۰/۴۶ و برای برگ ۳۲/۸۴ بود. همچنین، کل فلاونوئیدها (mg QE/mg عصاره) برای دانه ۱۶/۶۳ و برای برگ ۲۵/۸۴ بود. کل آلکالوئیدهای بذر حدود ۷ درصد، میزان هارمین آنها ۲/۹۳ درصد و هارمالین ۳/۸ درصد و مقادیر هارمان و هارمول و هارمالول ناچیز در ۰/۰۲ درصد است. کل آلکالوئید برگ حدود ۰/۲ درصد، با محتوای هارمین ۰/۰۵۵ درصد، هارمالین ۰/۰۵ درصد و هارمان و هارمول و هارمالول حدود ۰/۰۲ درصد است. کروماتوگرام در ۳۳۰ نانومتر وضوح کامل تمام پیک‌ها را با HPLC نشان داد (شکل ۲). بر اساس یافته‌ها، ۱۵۰ میلی‌گرم عصاره شامل ۶/۵ میلی‌گرم هارمین بود. با استفاده از FTIR، هارمین را می‌توان به عنوان ماده اصلی در نمونه‌های استخراج شده از بذر و برگ تعیین کرد. جذب *P. harmala* نسبت به استاندارد Harmine در نواحی فرکانس $cm^{-1}$ ۴۵۰۰ -۵۰۰ در شکل ۲ نشان داده شده است. طیف *P. harmala* با استاندارد هارمین مطابقت دارد. جذب عصاره در اعداد موج‌های مختلف ۱۰۷۲، ۱۲۳۷، ۱۴۵۵، ۱۶۲۴، ۳۰۷۲ به ترتیب مربوط به گروه‌های عاملی مختلفی مانند (C-H)، (C=O)، (C=N)، (O-CH3) و (C-N) بود. مقایسه آلکالوئید با هارمین چهار نوار شدید را در ۳۴۴۸، ۲۹۲۶، ۱۶۵۳، ۱۳۸۵ همراه با $cm^{-1}$ ۱۰۶۰ نشان داد (شکل ۳). جذب در ناحیه $cm^{-1}$ ۳۴۰۰ که با آب پوشیده شده مربوط به N-H می باشد. جذب در ناحیه $cm^{-1}$ ۱۵۵۰ مربوط به کششی C-N و خمشی N-H می باشد. جذب‌ها در ناحیه $cm^{-1}$ ۱۴۵۰- ۱۶۵۰ نشان دهنده حلقه آروماتیکی هارمین است. جذب در ناحیه $cm^{-1}$ ۱۰۰۰ مربوط به C-O می‌باشد. جذب در ناحیه $cm^{-1}$ ۱۶۴۰- ۱۶۹۰ مربوط به C=N است. در جدول ۱، درصد آلکالوئیدها، فلاونوئید و ترکیبات فنلی عصاره برگ و دانه و همچنین توانایی آنها برای مهار رادیکال‌های آزاد در اینجا مقایسه شده است( Scav = scavenger، IC50 = نیمه حداکثر غلظت مهاری).

**آنالیز خواص آنتی‌اکسیدانی**

روش DPPH اغلب برای اندازه‌گیری و غربالگری فعالیت آنتی‌اکسیدانی مواد در شرایط آزمایشگاهی استفاده می‌شود. چندین اولویت برای این روش وجود دارد، از جمله عملیات ساده، حساسیت بالا و قابلیت تکرار خوب. ۵۰٪ فعالیت مهار رادیکال (IC50) غلظت آنتی اکسیدان با کاهش غلظت DPPH به ۵۰٪ است. هنگامی که IC50 کاهش می‌یابد، ظرفیت مهار رادیکال آزاد آنتی‌اکسیدان قوی‌تر می‌شود. هنگامی که IC50 افزایش می‌یابد، فعالیت مهار ضعیف‌تر می‌شود. IC50 عصاره دانه ۶۸/۹٪ و IC50 عصاره برگ ۳۴٪/۷ است (جدول ۱، شکل ۴).

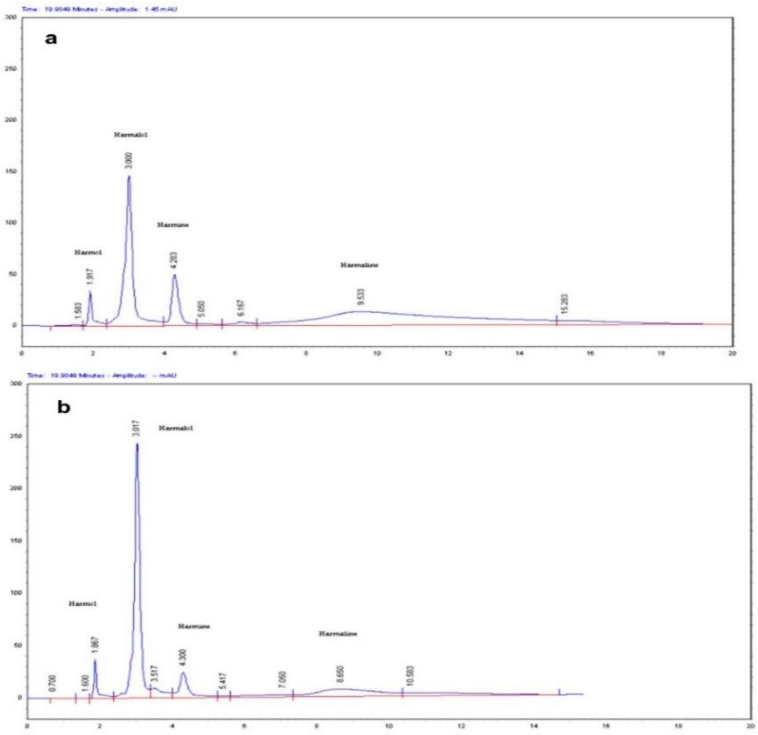


[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20 ]

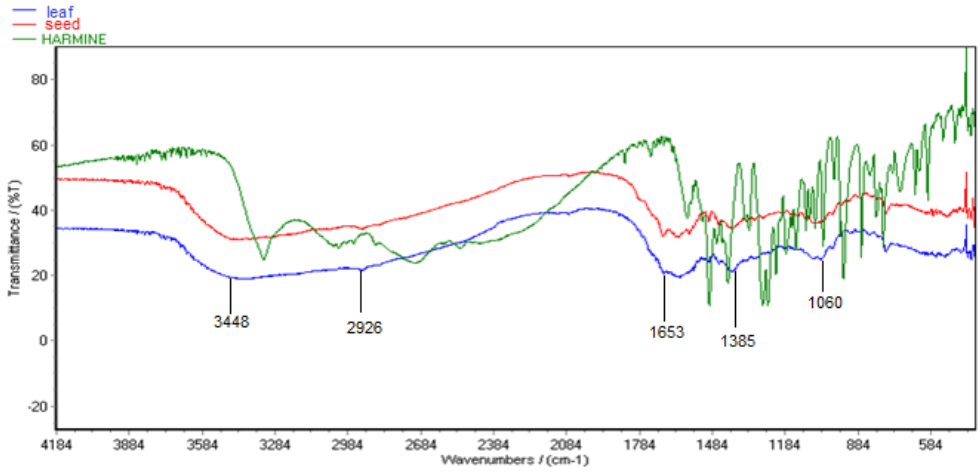
[ DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.52.1.5 ]

**مقاله پژوهشی**






**شکل ۲**- نمودار HPLC ترکیبات بتاکاربولینی در عصاره متانولی برگ (a) و دانه (b) را نشان می‌دهد که شامل هارمول، هارمالول، هارمین و هارمالین می‌باشد.




**شکل ۳**- طیف FTIR عصاره برگ به رنگ آبی و عصاره دانه به رنگ قرمز و هارمین خالص به رنگ سبز سبز را نشان می‌دهد.

| ترکیبات زیست فعال عصاره | درصد عصاره (%) | کل آلکالوئیدها | | | | | آنتی اکسیدانی | | کل فنولی (mg GAE/mg extract) at 200 mg/mL | کل فلاونوئیدی (mg QE/mg extract) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | هارمین | هارمالین | هارمن | هارمول | هارمالول | $IC_{50}$ | %Scav | | |
| دانه | ۲۹/۷ | ۲/۹۳ | ۳/۸ | ۰/۰۲۹ | ۰/۰۲۰ | ۰/۱۲۰ | ۱۲۲/۱ | ۶۸/۹ | ۳۰/۴۶ | ۱۶/۶۳ |
| برگ | ۳۱/۷ | ۰/۰۵۵ | ۰/۰۵ | ۰/۰۱۱ | --- | ۰/۰۲۶ | >۲۰۰ | ۳۴/۷ | ۳۲/۸۴ | ۲۵/۸۴ |

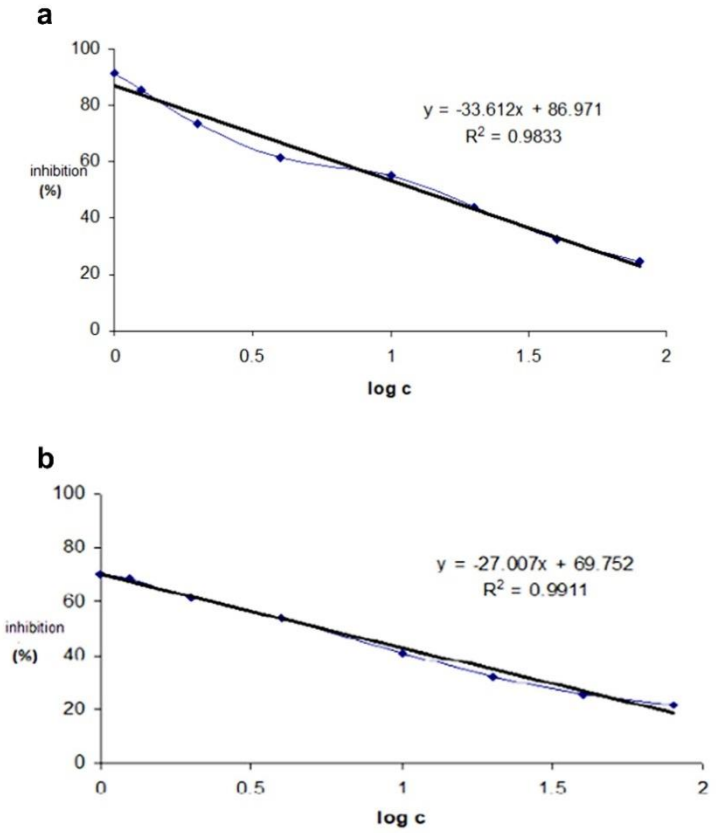
**جدول ۱**- ترکیبات زیست فعال عصاره‌های متانولی برگ و دانه اسپند

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.52.1.5 ]

**مقاله پژوهشی**






**شکل ۴**- نمودار آنالیز آنتی‌اکسیدانی یا DPPH عصاره متانولی برگ (a) و دانه (b)

## بحث

داده‌های مطالعه حاضر در قسمت میزان مواد مؤثره موجود در عصاره‌ها نشان می‌دهد که عصاره آبی–متانولی دانه ۲۹٪/۷ و برگ ۳۱/۷ ٪ می‌باشد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد و $IC_{50}$ برای دانه ( ۲۰۰ mg/mL) ۶۸/۹ و ۱۲۲/۱ و برای برگ ( ۲۰۰ mg/mL) ۳۴/۷ و بیشتر از ۲۰۰ می باشد و ترکیبات کل فنولی برای دانه (mg GAE/mg) ۱۶/۶۳ و برای برگ (mg QE/mg) ۲۵/۸۵ می‌باشد. کل آلکالوئیدها برای دانه حدود ۷٪ که مقدار هارمین آن ۲/۹۳٪ و هارمالین آن ۳/۸٪ و مقادیر هارمن و هارمول و هارمالول ناچیز در حد ۰/۰۲٪ می‌باشد و برای برگ، کل آلکالوئیدها حدود ۲٪/۰ که مقدار هارمین ۰/۰۶٪، هارمالین ۰/۰۵٪ و مقادیر هارمن و هارمول و هارمالول هر کدام حدود ۰/۰۲ ٪ می‌باشد. همسو با نتایج مطالعه حاضر، مطالعه Herraiz و همکارانش نشان داد که بتاکاربولین‌ها در دانه و ریشه تجمع می‌یابند در حالی که مقادیر اندکی از آنها در برگ و ساقه این گیاه وجود دارد و در گل‌ها اصلاً وجود ندارند. این غلظت‌های بتاکاربولین در دانه و ریشه بسیار بالا می‌باشد به طوری که غلظت هارمین و هارمالین بیش از ۱۰٪ w/w می‌باشد (۱۲). پروفایل مولکولی آلکالوئیدها در گیاه بسیار متفاوت می‌باشد به طوری که هارمین (۲٪ w/w) و هارمول (۱/۴ w/w) به طور غالب در ریشه، و هارمین و هارمالین در دانه وجود دارند. به طرز جالبی، هارمالین تقریباً به طور انحصاری در دانه یافت می‌شود در حالی که، هارمول به طور غالب در ریشه و در ساقه یافت می‌شود. هارمالول نیز در میوه‌ها و دانه‌ها وجود دارد. مقادیر اندک تتراهیدروهارمین در دانه وجود دارد اما نه نورهارمن (بتاکاربولین) و نه هارمن (۱- متیل- بتا کاربولین) در دانه حضور ندارند و مورد آخر برخلاف بررسی حاضر است که نشان می‌دهد هارمن هر چند در مقادیر کم؛ در دانه نیز موجود می‌باشد. نتایج مطالعه Callaway و همکارانش نشان داد که β – کاربولین‌ها در تعدادی از گیاهان از جمله اسپند از خانواده زیگوفیلاسه وجود دارند به طوری که عصاره این گیاهان فعالیت های روانگردان را میانجیگری می‌کند و یا به طور بالقوه بوسیله این ترکیبات انجام می‌گیرد (۳). نتایج مطالعه سمیرا کرم‌سیچانی و همکارانش نشان می‌دهد که عصاره اتانولی اسپند از طریق افزایش معنی دار آنزیم‌های آنتی- اکسیدان و کاهش مالون دی آلدئید باعث از بین بردن

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.52.1.5 ]

رادیکال‌های آزاد حاصل از نانو ذرات نقره می‌شود (۱۹). همسو با نتایج مطالعه حاضر، مطالعه Pandey و همکارانش در غربالگری اولیه فیتوشیمیایی بر روی عصاره‌های اتانولی، آبی و دی اتیل اتری *P. harmala* نشان دادند که در این گیاه ترکیباتی همچون فلاونوئید، آلکالوئید، تانن‌ها، ترپن‌ها، استرول، آنتروکوئینون‌ها، کومارین‌ها و روغن‌های فرار حضور دارند (۲۰). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ *P. harmala* با تعیین اثر آن بر روی مهار پراکسیداسیون لیپیدی به روش آمونیوم تیوسیانات آشکار شد. در این سنجش، اکسیداسیون لینوئیک اسید، به طور مؤثری توسط عصاره متانولی برگ *P. harmala*، پس از انکوباسیون به مدت پنج روز مهار گردید. عصاره متانولی در مقایسه با گروه کنترل مثبت توکوفرول یک فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را از خود نشان داد. این فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی احتمالاً به طور غالب با حضور ترکیبات فنولی همچون فلاوونوئیدها و تانن‌های یافت شده در عصاره متانولی، مرتبط است. رابطه بین محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین اندام‌های گیاه، یکی از ابعاد جالب توجه است؛ به طوری که از این فرضیه که ترکیبات قبلی به طور مستقیم به فعالیت آنتی-اکسیدانی کمک می‌کنند؛ حمایت می‌نماید (۲۱، ۲۲). با توجه به جدول شماره ۱ درصد مهار رادیکال‌های آزاد و $IC_{50}$ برای عصاره متانولی دانه ( ۲۰۰ mg/ml) ۶۸/۹ و ۱۲۲/۱ و برای عصاره متانولی برگ ( ۲۰۰ mg/ml) ۳۴/۷ و بیشتر از ۲۰۰ می باشد.

## نتیجه‌گیری

می‌توان چنین استنتاج نمود که عصاره دانه (اسپند زاهدان) به علت داشتن مقدار زیاد آلکالوئیدها اثر تخدیری و روانگردانی بیشتری داشته و با توجه به مقادیر آنتی-اکسیدانی به علت پلی‌فنل‌ها و فلاوونوئیدها اثر نسبی در کاهش استرس و مهار رادیکال‌های آزاد دارد. در عصاره برگ (اسپند زاهدان) مقادیر آلکالوئیدها ناچیز است و به تبع آن اثرات تخدیری آن کمتر می‌باشد و اثرات آنتی‌اکسیدانی آن به علت مقادیر بیشتر پلی‌فنلی و فلاونوئیدها و نیز اثرات آن در مهار رادیکال‌های آزاد، بیشتر می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از آقای دکتر ایران بخش و مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی، تهران، ایران برای انجام مطالعه تشکر می کنند.



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.52.1.5 ]

## منابع


1. Moloudizargari M, Mikaili P, Aghajanshakeri S, Asghari MH, Shayegh J. Pharmacological and therapeutic effects of Peganum harmala and its main alkaloids. Pharmacogn Rev, 2013; 7(14):199-212.
2. Bahmani M, Rafieian-kopaei M, Parsaei DP, Mohsenzadegan A. The anti-leech effect of Peganum harmala L. extract and some anti-parasite drugs on Limnatis Nilotica. Afr J Microbiol Res, 2012; 6: 2586-2590.
3. Callaway JC, Brito GS, Neves ES. Phytochemical analyses of Banisteriopsis caapi and Psychotria viridis. J psychoactive drugs, 2005; 37(2):145-150.
4. Alireza Safahani, Mehrdad Ataie, Mohammad Rabie, Tina Dadgar, Ezzatollah Ghaemi. comparison of antibacterial activity of some of the medical plants extracts of Golestan province against Staphylococcus aureus. J Herb Drug, 2011; 1(4):41-51.
5. Darabpour E, Poshtkouhian Bavi A, Motamedi H, Seyyed Nejad SM. Antibacterial activity of different parts of Peganum harmala L. growing in Iran against multi-drug resistant bacteria. EXCLI J, 2011; 10:252-263.
6. Diba K, Geramishoar M, Sharbatkhori LH. Antifungal activity of alcoholic extract of peganum harmala in vitro. UMJ, 2010; 20(4):271-277.
7. Hulya Ozdemir KDD. Investigation of anti-hyperglycemic effect of Peganum harmala seeds (Zygophyllaceae) on Streptozotocin diabetic rats. In Berlin, Germany: 5th Annual European Pharma Congress July 18-20, 2016; 2016.
8. Forouzandeh F, Salimi S, Naghsh N, Zamani N, Jahani S. Evaluation of anti-cancer effect of Peganum harmala L hydroalcholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line TT. JSKUMS, 2014; 16(4):1-8.
9. Perez Martin JM, Labrador V, Fernandez Freire P, Molero ML, Hazen MJ. Ultrastructural changes induced in HeLa cells after phototoxic treatment with harmine. J Appl Toxicol, 2004; 24(3):197-201.
10. Abe A, Yamada H. Harmol induces apoptosis by caspase-8 activation independently on Fas/Fas ligand interaction in human lung carcinoma H596 cells. Anti-cancer drug, 2009; 20(5):373-381.
11. McKenna DJ. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. Pharmacol Ther, 2004; 102(2):111-129.
12. Herraiz T, Gonzalez D, Ancin-Azpilicueta C, Aran VJ, Guillen H. beta-Carboline alkaloids in Peganum harmala and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). Food Chem Toxicol, 2010; 48(3):839-845.
13. Ishida J, Wang HK, Bastow KF, Hu CQ, Lee KH. Antitumor agents 201. Cytotoxicity of harmine and beta-carboline analogs. Bioorg Med Chem lett, 1999; 9(23):3319-3324.
14. Brkljaca R, White JM, Urban S. Phytochemical investigation of the constituents derived from the Australian plant Macropidia fuliginosa. J Nat Prod, 2015; 78(7): 1600-1608.
15. Abderrahman SM, Soliman S, Mohammad MG. Genotoxic effects of Peganum harmala L. in relation to traditional use. J Pharmacogn Phytotherapy, 2018; 10(9):167-173.
16. Amadioha A, Chidi KP. Phytochemical composition of aqueous and ethanolic leaf extracts of Piper guineense, Cassia alata, Tagetes erecta and Ocimum graticimum. J Pharm Res Int, 2019;1-8.
17. Trease GE, Evans WC. Pharmacognosy. London: Bailliere Tindall Press; 1983. p .309 –706.
18. Chandrasekar D, Madhusudhana K, Ramakrishna S, Diwan PV. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: a sensitive screening method for polyherbal formulations. J Pharm Biomed Anal, 2006; 40(2):460-464.
19. Karam Sichani Samira. Naghsh Nooshin RN. Effects of Alcoholic Extract of Peganumharmala L. on Malondialdehyde Concentration and Catalaseand Glutathione Peroxidase Activity in Mice Treated with Nanosilver Particles TT. J Maz Univ Med Sci, 2012; 22:10-7.
20. Pandey RK, Shukla SS, Tiwari R, Chauhan NS. Peganam harmala Indian traditional plant: a scientific update. Spatula DD, 2016; 6(4):103-112.
21. Hayet E, Maha M, Mata M, Mighri Z, Laurent G, Mahjoub A. Biological activities of Peganum harmala leaves. Afr J Biotechnol, 2010; 9(48): 8199-8205.
22. Rezzagui, A., Merghem, M., Derafa, I., Dahamna, S. Acute and Sub-acute Toxic Effects of Algerian Peganum harmala L. Crud Extract. J Drug Deliv Ther, 2020; 10(2):115-121.


[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.52.1.5 ]